

Εργαστηριακές ασκήσεις ΜΒ

+

Άσκηση 1 - α

Απομόνωση DNA από ζωικό ιστό

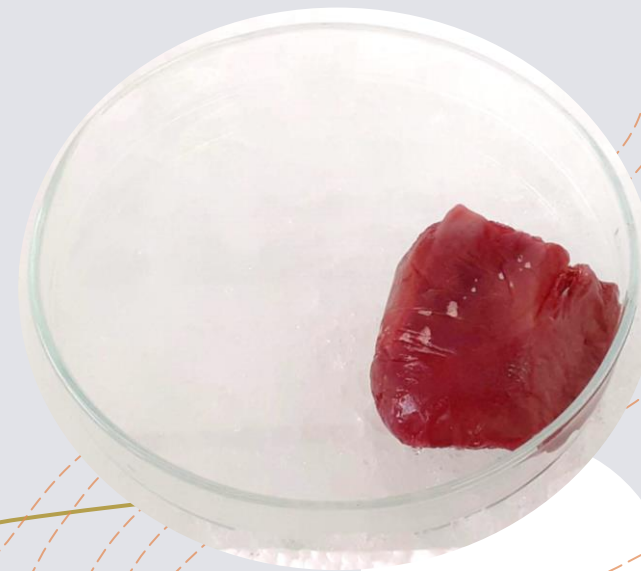
Θεωρία

Το DNA είναι η πρώτη ύλη των περισσότερων πειραμάτων Μοριακής Βιολογίας. Ειδικά το χρωμοσωμικό DNA μπορεί γενικά να χρησιμοποιηθεί σε μια ποικιλία πειραμάτων όπως π.χ. ανάλυση κατά Southern, κατασκευή χρωμοσωμικών βιβλιοθηκών, εύρεση καμπύλης τήξης, PCR κλπ.

Αν και για κάθε διαφορετικό τύπο DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό κλπ.), υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης, όλες έχουν κοινά στοιχεία:

1. Ελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή μετά από σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων όπως οι πυρήνες.
2. Διαχωρισμός του DNA από άλλα μακρομόρια.

Στην άσκηση αυτή θα απομονωθεί χρωμοσωμικό DNA από σπυρίδι μοσχαριού.



Γενικό πλάνο απομόνωσης χρ. DNA –ολ. RNA από ιστό

Ομογενοποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος
(0.14 M NaCl - 0.01 M NaCitrate, pH 7.3)

(Σπάσιμο κυττάρων και υποκυτταρικών οργανιδίων, ελευθέρωση
DNPs, RNPs, κυτταροπλασματικών συστατικών)



Φυγοκέντρηση ομογενοποιηήματος
(διαχωρισμός διαλυτών-αδιάλυτων συστατικών)



Ίζημα

(αδιάλυτα: DNPs, μεμβράνες)



Υπερκείμενο

(διαλυτά: RNPs, κυτταροπλασματικά συστατικά)



Αναδιάλυση του ιζήματος σε **διάλυμα υψηλής αλατότητας** (2,6 M NaCl)
(καθαρισμός/διαλυτοποίηση DNA, κατακρήμνιση πρωτεϊνών)



Φυγοκέντρηση



Κρατάμε υπερκείμενο



Κατακρήμνιση DNA με προσθήκη
2 όγκων αιθανόλης 95%



Προσθήκη **SDS** και διαδοχικές εκχυλίσεις με **φαινόλη/χλωροφόρμιο** (καθαρισμός του RNA από πρωτεΐνες)



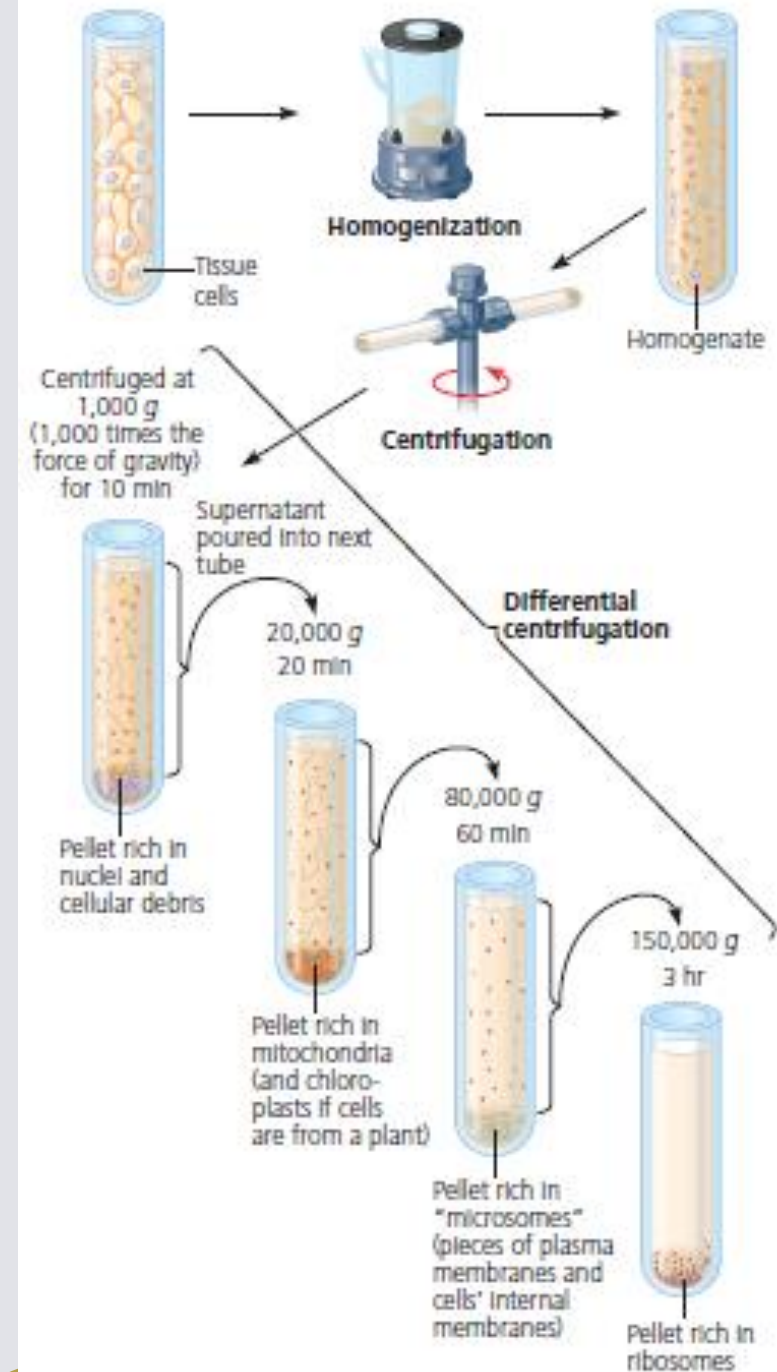
Φυγοκέντρηση



Κρατάμε τελική υδατική φάση



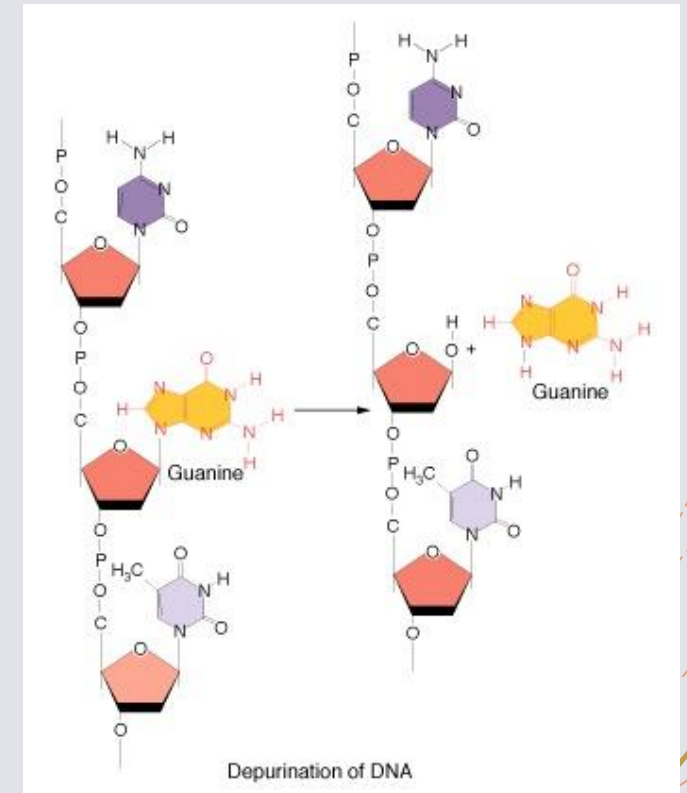
Κατακρήμνιση RNA με προσθήκη
2 όγκων αιθανόλης 95%



Παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή του DNA

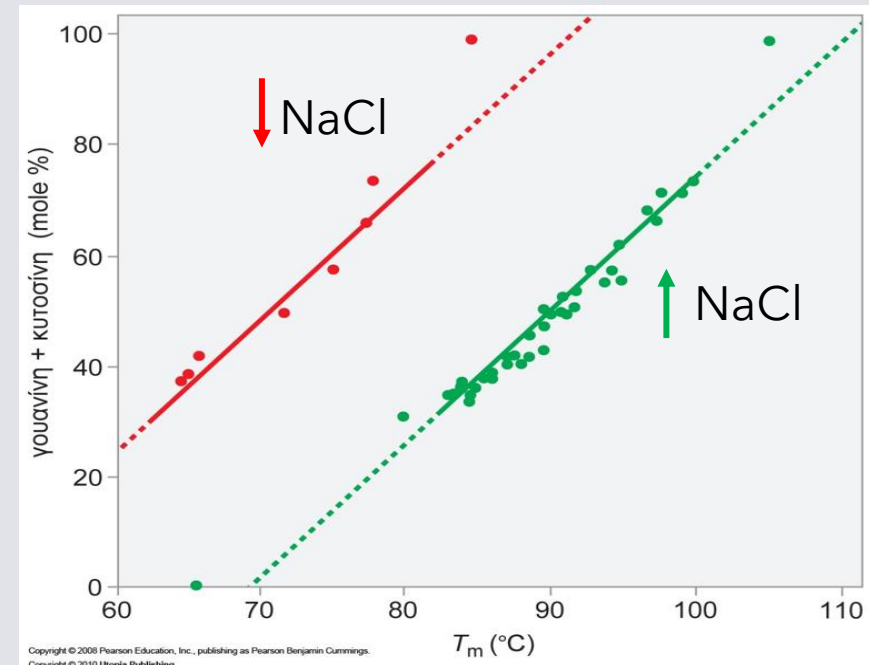
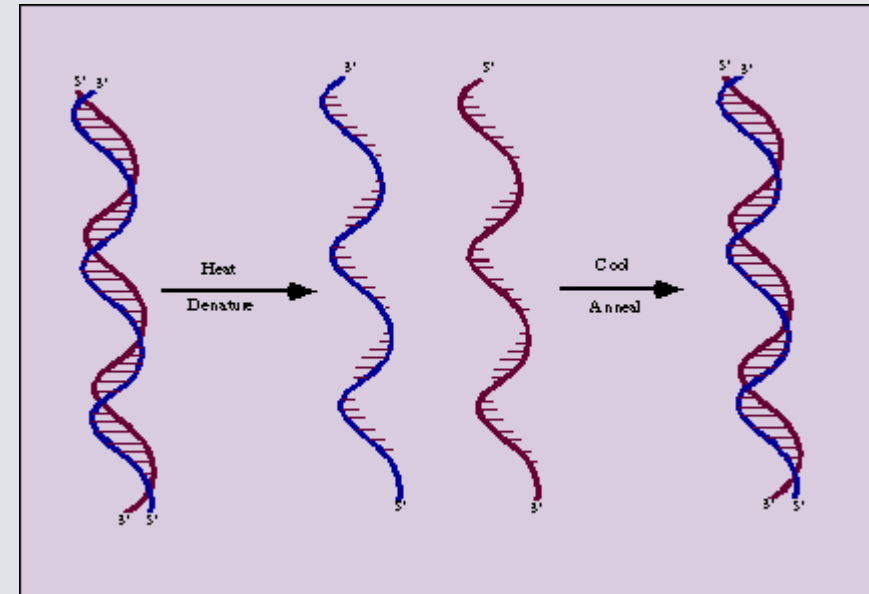
Κατά τη διάρκεια της πειραματικής εργασίας πρέπει να τηρούνται ορισμένες συνθήκες για να αποφύγουμε μεγάλες αλλαγές στην τριτοταγή δομή του DNA. Στο DNA μπορεί να προκληθούν δομικές αλλαγές από διάφορους παράγοντες, όπως:

1. Θραύση φωσφοδιεστερικών δεσμών από επίδραση **νουκλεολυτικών ενζύμων** (π.χ., **DNase**)
2. Θραύση των N-γλυκοζιδικών δεσμών μεταξύ δεοξυριβόζης και πουρινών με την **επίδραση οξέος** ($\text{pH} < 2$). Η αντίδραση αυτή ονομάζεται «**αποπουρίνωση**» (**depurination**) του DNA και το καθιστά **ευάλωτο για θραύση σε υψηλή θερμοκρασία** (π.χ., $>90^\circ\text{C}$) παρουσία άλλων χημικών παραγόντων (π.χ., βλέπε αντίδραση Maxam).



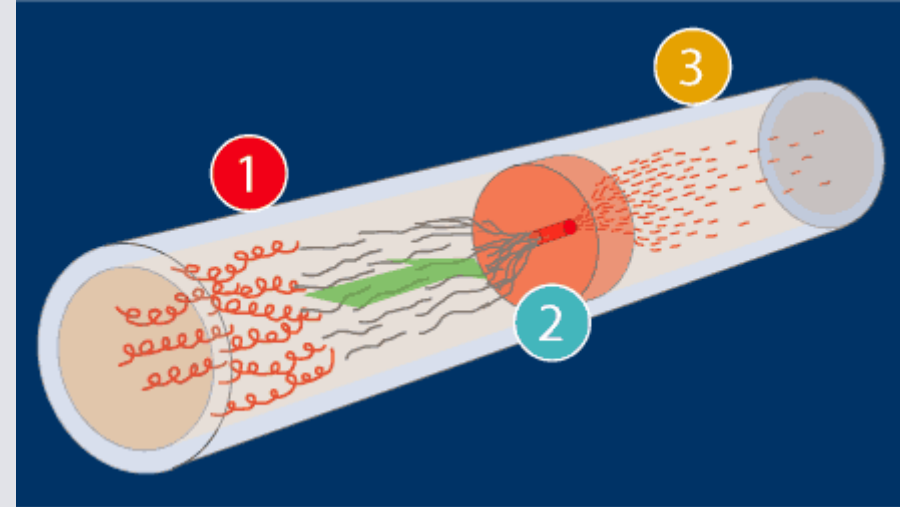
3. Καταστροφή των υδρογονικών δεσμών, που κρατούν μαζί τις δύο αλυσίδες του DNA, με αποτέλεσμα την **αποδιάταξη** (οι αλυσίδες αποχωρίζονται εντελώς) ή την **αποσύνδεση** (οι αλυσίδες αποχωρίζονται μερικώς) των αλυσίδων από:

- επίδραση **βάσης** ($\text{pH} > 10$)
- επίδραση **θερμότητας** και σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση άλατος στο διάλυμα, αλλά και αποδιατακτικών παραγόντων που μειώνουν την ιονική ισχύ (π.χ., θερμοκρασία $> 80^\circ\text{C}$ σε 0.01 N NaCl , ενώ $>90^\circ\text{C}$ σε 1.0 N NaCl , ή και $\sim 50^\circ\text{C}$ παρουσία φορμαμίδιου)
- από **μείωση της ιονικής ισχύος**. Η θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA εξαρτάται από την ιονική ισχύ. Π.χ., σε πλήρως απεσταγμένο νερό η θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA είναι μικρότερη των 25°C .



4. Θραύση της διπλής έλικας σε μικρότερα κομμάτια με την επίδραση μηχανικών αιτίων. Σημειώνεται ότι λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ένα μακρομοριακό DNA «διπλώνει» σε σφιχτές τυχαίες δομές, οι οποίες δημιουργούν ισχυρότατες δυνάμεις θραύσης ακόμη και ομοιοπολικών δεσμών (όπως οι φωσφοδιεστερικοί). Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η απομόνωση DNA με οποιαδήποτε μέθοδο δεν οδηγεί ποτέ σε απομόνωση DNA ολόκληρων χρωμοσωμάτων).

DNA shearing (ψαλίδισμα DNA με άσκηση υψηλής πίεσης)



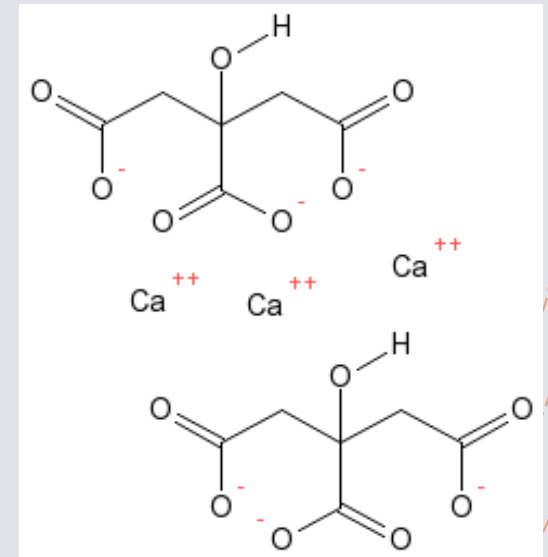
Προστασία του DNA

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης DNA **αποφεύγονται**:

- ❖ οι ακραίες τιμές pH,
- ❖ η υψηλή θερμοκρασία και
- ❖ η χαμηλή ιονική ισχύς.

Αν και το σπυκώτι περιέχει ενεργή δεοξυριβονουκλεάση (DNase), όπως και οι περισσότεροι φυτικοί και ζωικοί ιστοί, η δράση του ενζύμου παρεμποδίζεται κατά την πειραματική διαδικασία από την παρουσία **χηλικού παράγοντα (κιτρικό ιόν)**. Επειδή η DNase για να δράσει χρειάζεται ένα δισθενές κατιόν, το κιτρικό παρεμποδίζει αποτελεσματικά τη δράση του ενζύμου γιατί δεσμεύει Ca^{+2} και Mg^{+2} .

Κατά την απομόνωση το DNA σπάει σε μικρότερα κομμάτια (κυρίως κατά την ομογενοποίηση), αλλά αυτό δεν αλλάζει την πρωτοταγή και δευτεροταγή δομή του μορίου και δεν έχει μεγάλη σημασία σε αυτό το πείραμα.

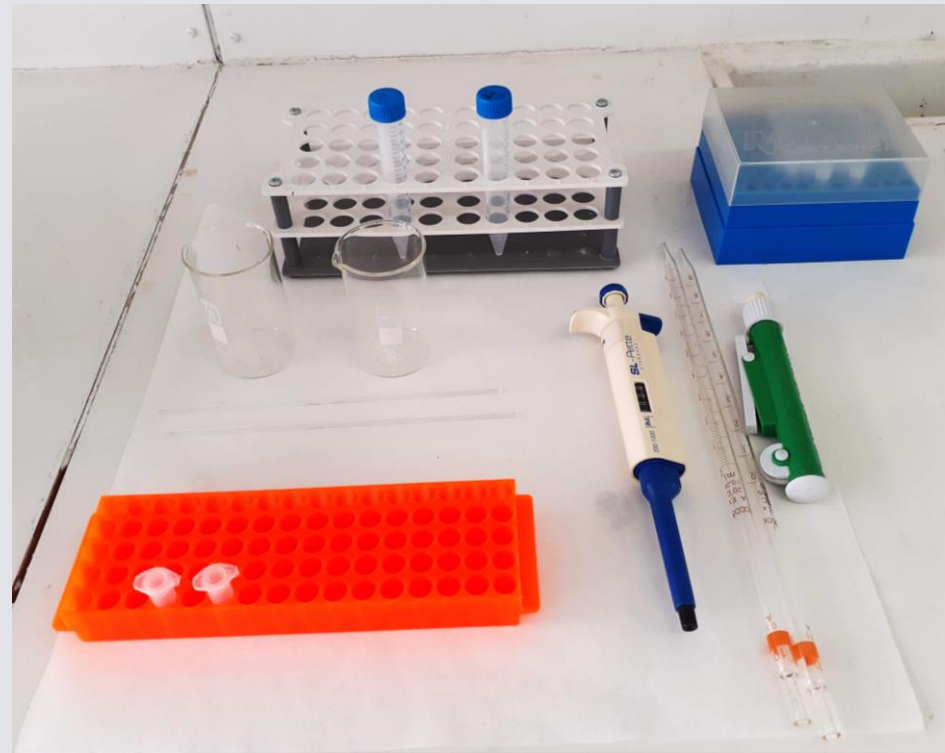
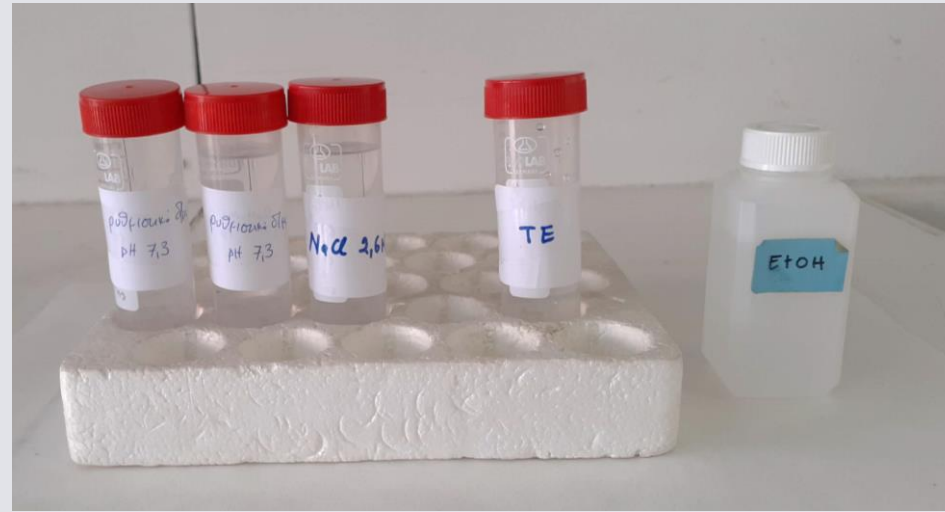


πείραμα

Υλικά:

- Συκώτι
- Ρυθμιστικό διάλυμα (0.14 M NaCl - 0.01 M NaCitate, pH 7.3)
- Διάλυμα άλατος 2,6 M NaCl
- 95% αιθανόλη
- Διάλυμα T.E. (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)
- Ομογενοποιητής
- Φυγόκεντρος, σωλήνες φυγοκέντρου, γυάλινη ράβδος, ποτήρια ζέσεως

στον πάγκο



Πειραματική διαδικασία

1. Τοποθετούμε περίπου 25 γραμμάρια συκώτι στο δοχείο του ομογενοποιητή, προσθέτουμε 100 ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος και ομογενοποιούμε.

Τεμαχισμός ιστού, σπάσιμο κυττάρων, απελευθέρωση κυτταροπλασματικών συστατικών.

2. Γεμίζουμε 2 σωλήνες φυγοκέντρου με 10 ml ομογενοποίηση. Ισοζυγίζουμε και φυγοκεντρούμε στις 6000 στροφές/λεπτό (rpm) (που αντιστοιχούν σε περίπου 5000 g) για 15 min.

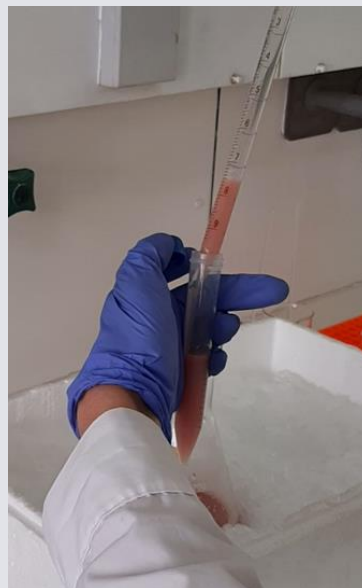
Στο ρυθμιστικό διάλυμα NaCl μικρής ιονικής ισχύος (0.14 M NaCl - 0.01 M NaCitate, pH 7.3) τα σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης (DNP) δεν είναι διαλυτά ενώ τα σύμπλοκα RNA-πρωτεΐνης (RNP) είναι. Έτσι, με τη φυγοκέντρηση μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα DNPs (στο ίζημα) από τα RNPs (στο υπερκείμενο).



ομογενοποίηση



φιλτράρισμα



μεταφορά σε σωλήνες
φυγοκέντρου

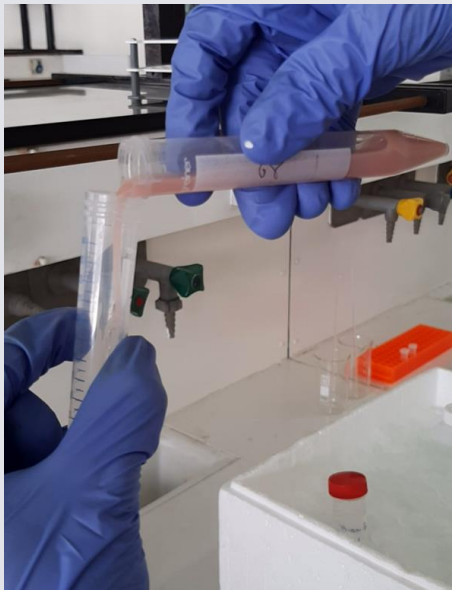


ισοζύγιση



φυγοκέντρηση

3. Μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα και το διατηρούμε στον πάγο. Το ίζημα που παραμένει μέσα στο σωλήνα, το αναδιαλύουμε πολύ καλά ρίχνοντας 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια, αφού ισοζυγίσουμε τους σωλήνες (με ρυθμιστικό διάλυμα) επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 2.



Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωλήνα



Προσθήκη στο ίζημα 10 ml ρυθμιστικού δ/ματος και αναδιάλυση



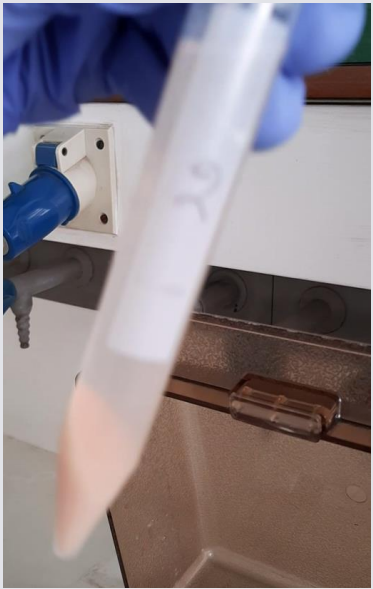
ισοζύγιση



φυγοκέντρηση

4. Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και αναδιαλύουμε το ίζημα σε 10 ml διαλύματος 2.6 M NaCl. Φυγοκεντρούμε ξανά όπως προηγουμένως, αφού ισοζυγίσουμε τους σωλήνες με διάλυμα 2.6 M NaCl.

Σε αυτή τη συγκέντρωση NaCl οι δεοξυριβονουκλεοπρωτεΐνες (DNP's) είναι διαλυτές. Επιπλέον, εφόσον αναδιαλυθεί τελείως το ίζημα, το NaCl σπάει τους ηλεκτροστατικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεΐνης και DNA, με αποτέλεσμα να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες.



Απόρριψη υπερκειμένου



Προσθήκη στο ίζημα 10 ml 2.6 M NaCl και αναδιάλυση



ισοζύγιση

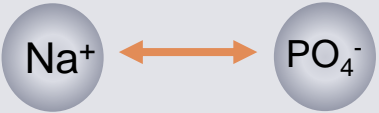
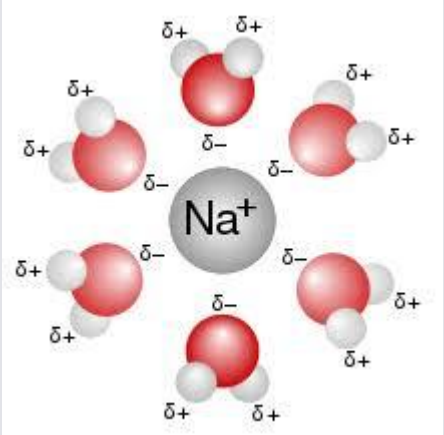
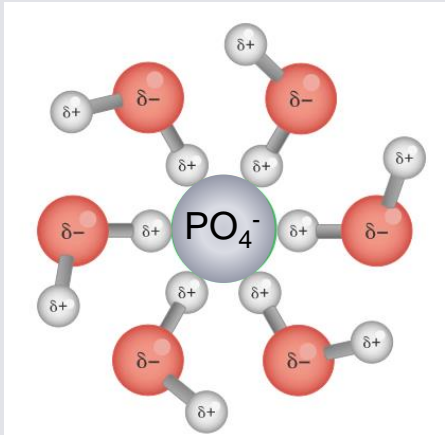
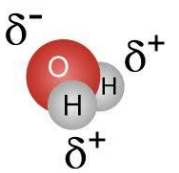
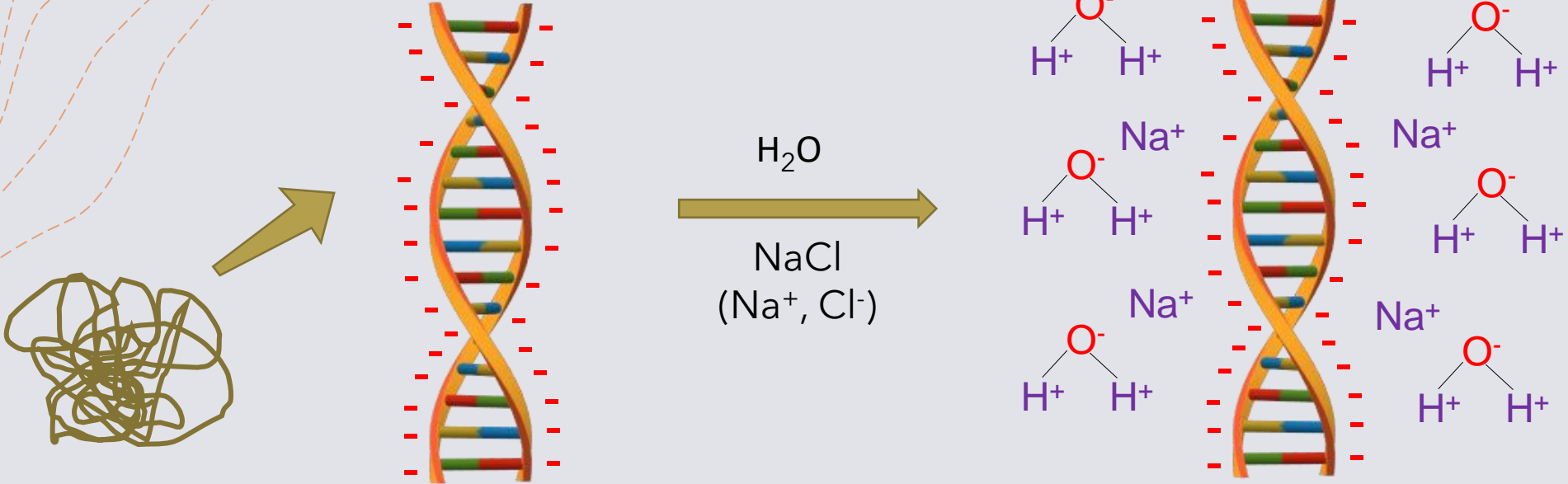


φυγοκέντρωση

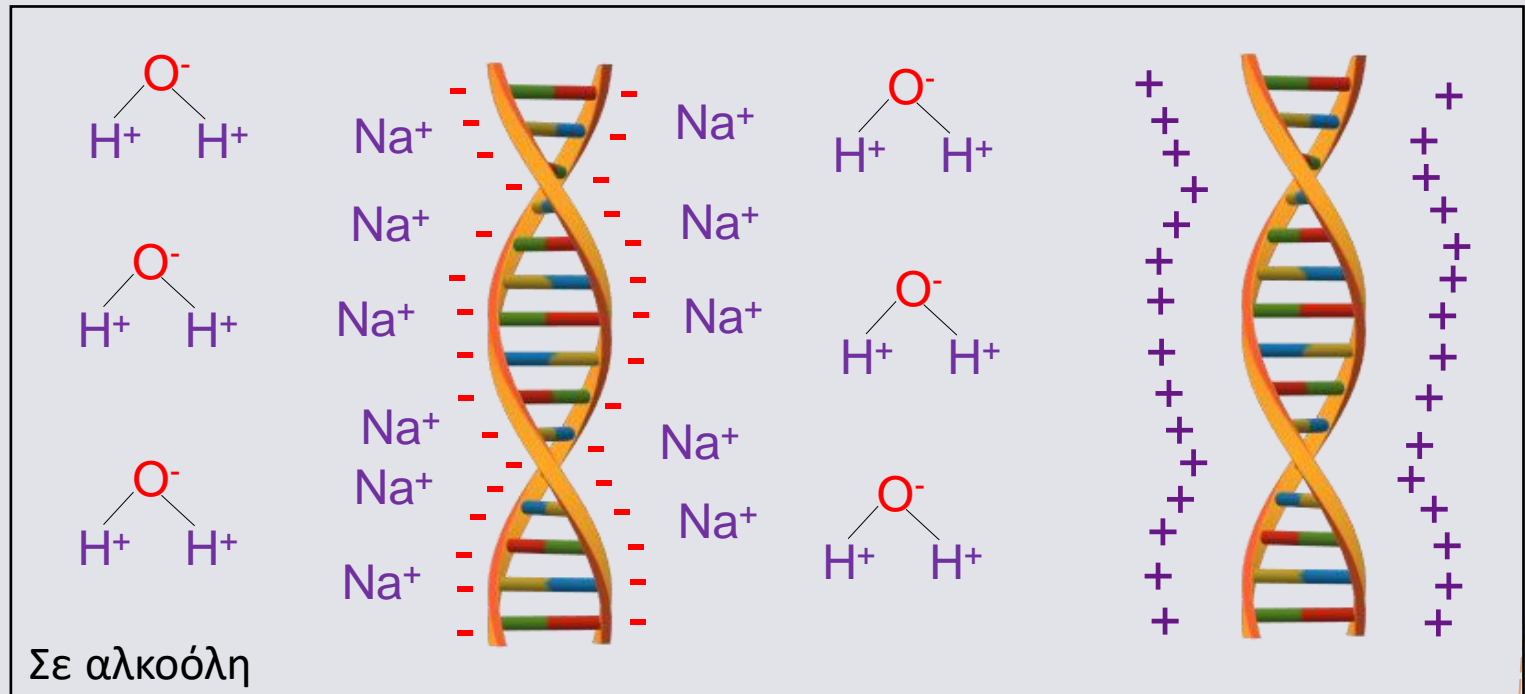
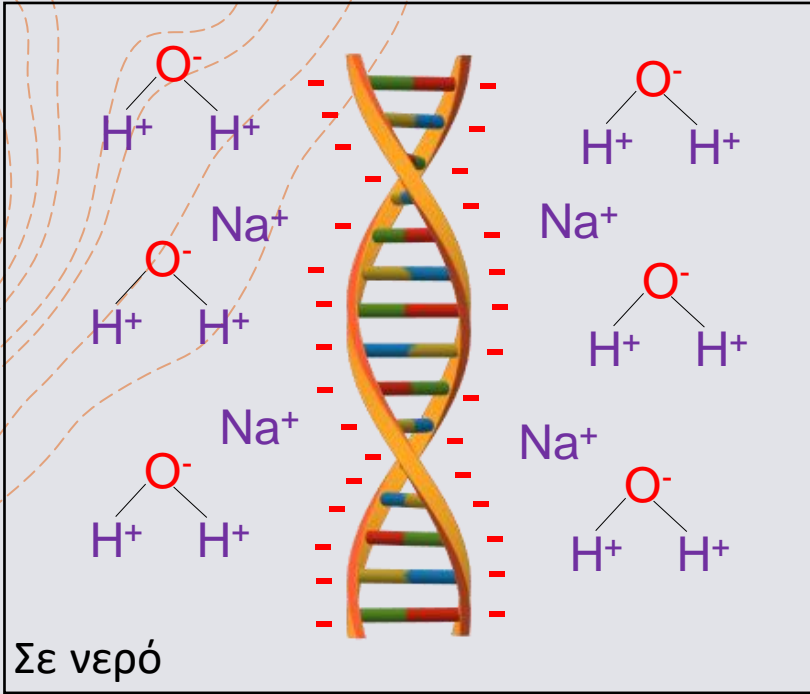
5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (στο οποίο βρίσκεται το DNA) σε ένα ποτήρι ζέσεως. Προσθέτουμε προσεκτικά δύο όγκους αιθανόλης (95%) προσπαθώντας να μην αναμιχθούν οι φάσεις. Στη μεσόφαση θα παρατηρήσουμε τη δημιουργία ενός άσπρου ιζήματος. Τότε αρχίζουμε να περιστρέφουμε τη γυάλινη ράβδο και καθώς η αιθανόλη θα κατεβαίνει προς τα κάτω, το ίζημα θα τυλίγεται γύρω από τη ράβδο.
6. Αφήνουμε τη ράβδο με το ίζημα στον αέρα για λίγο ώστε να στεγνώσει η αιθανόλη και στη συνέχεια μεταφέρουμε σε σωλήνα που περιέχει 1 ml διαλύματος TE για να διαλυθεί.
7. Ο σωλήνας που περιέχει το DNA φυλάσσεται στους 4° C. Μέρος αυτού θα χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό.



Περί κατακρήμνισης DNA



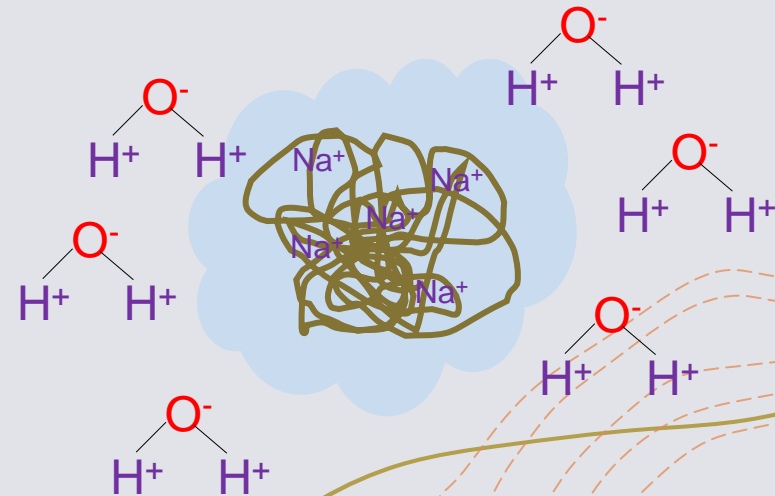
Περί κατακρήμνισης DNA



$$F = k \frac{Q_1 \cdot Q_2}{r^2}$$

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_r} \cdot \frac{Q_1 \cdot Q_2}{r^2}$$

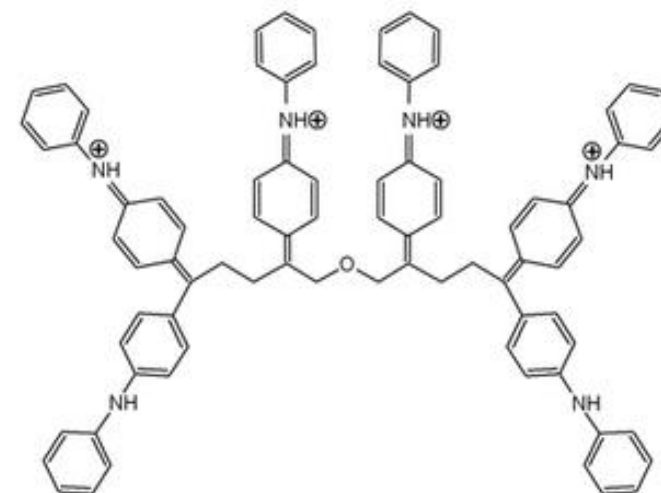
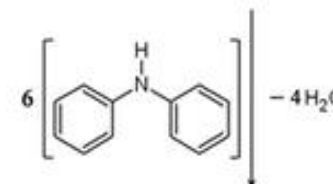
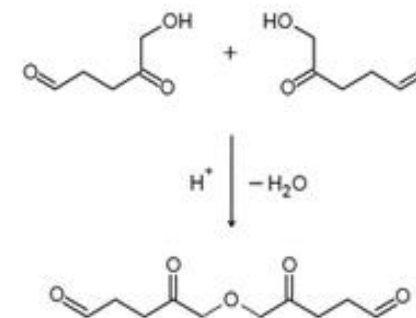
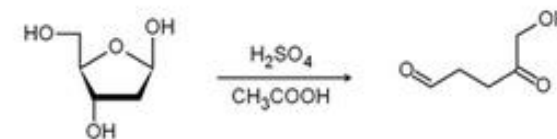
Μέσο	Διηλεκτρική σταθερά
Νερό	$\epsilon_r = 80$ (+) (-)
Αιθανόλη	$\epsilon_r = 24$ (+) (-)
Ισοπροπανόλη	$\epsilon_r = 18$ (+) (-)



Αρχή της μεθόδου

- Επίδραση **πυκνού οξέος** ($\text{pH} < 2$) \rightarrow **αποπουρίνωση**
- **Θέρμανση** ($> 90^\circ\text{C}$) \rightarrow **θραύση** φωσφοδιεστερικών δεσμών
απελευθέρωση **δεοξυριβοζών**
- Αντίδραση **δεοξυριβόζης** με διφαινυλαμίνη \rightarrow **μπλε χρώμα**

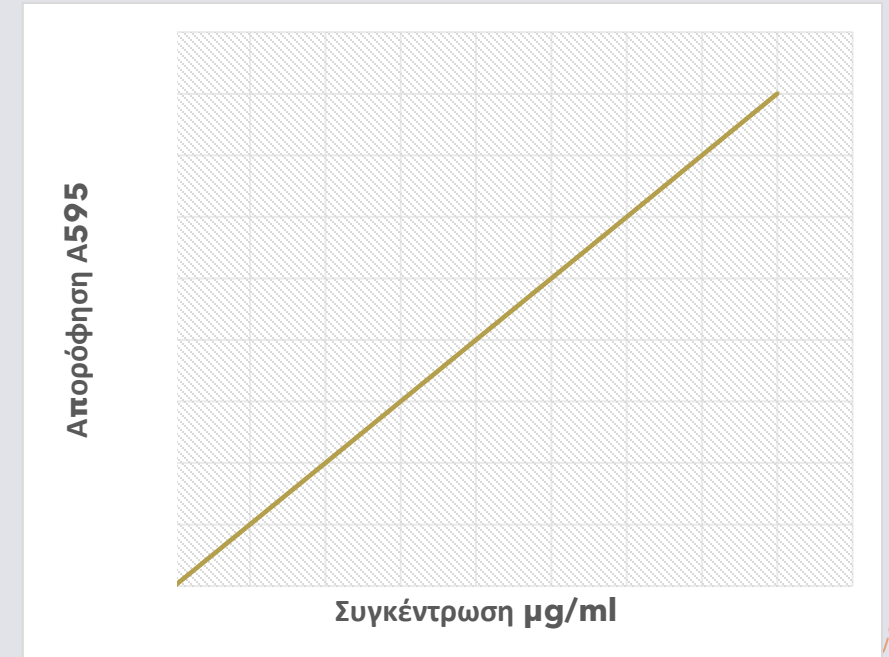
διφαινυλαμίνη



πρότυπη καρπύλη – φωτομέτρηση

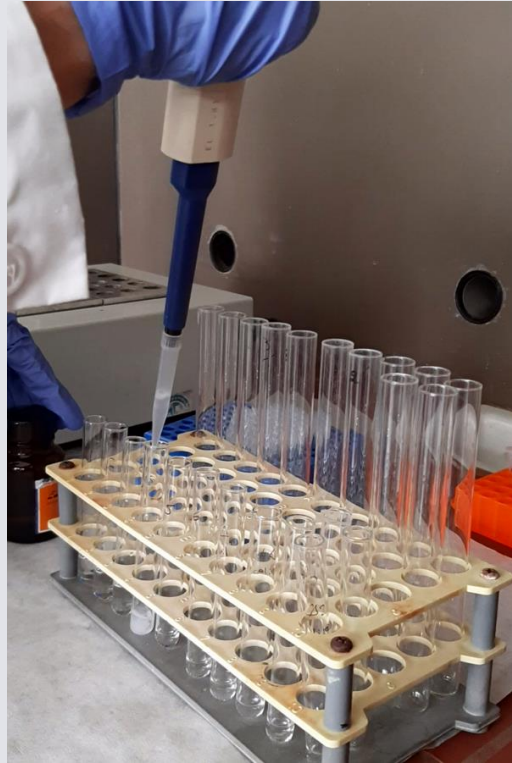
Σωλήνας	Πρότυπο διάλυμα DNA (200μg/ml) (ml)	H ₂ O (ml)	Συγκέντρωση (μg/ml)	Διφαινούλα μίνη (ml)	A595
Blank	-	1		2	
1	0,2	0,8		2	
2	0,4	0,6		2	
3	0,6	0,4		2	
4	0,8	0,2		2	
5	1,0	-		2	

Δείγμα DNA 1: αραίωση 10X (1:10), αραίωση 100X (1:100)
Δείγμα DNA 2: αραίωση 10X (1:10), αραίωση 100X (1:100)

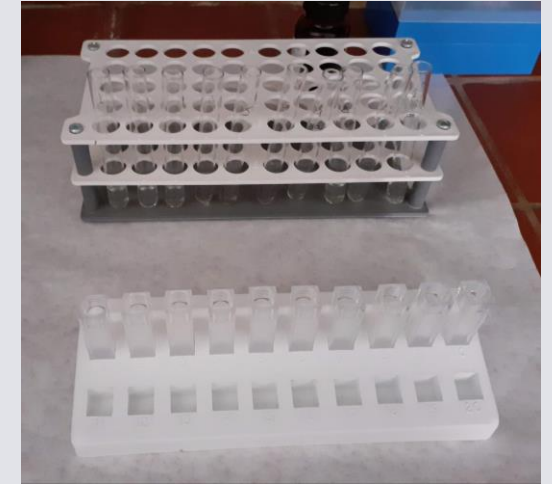




Προετοιμασία δειγμάτων

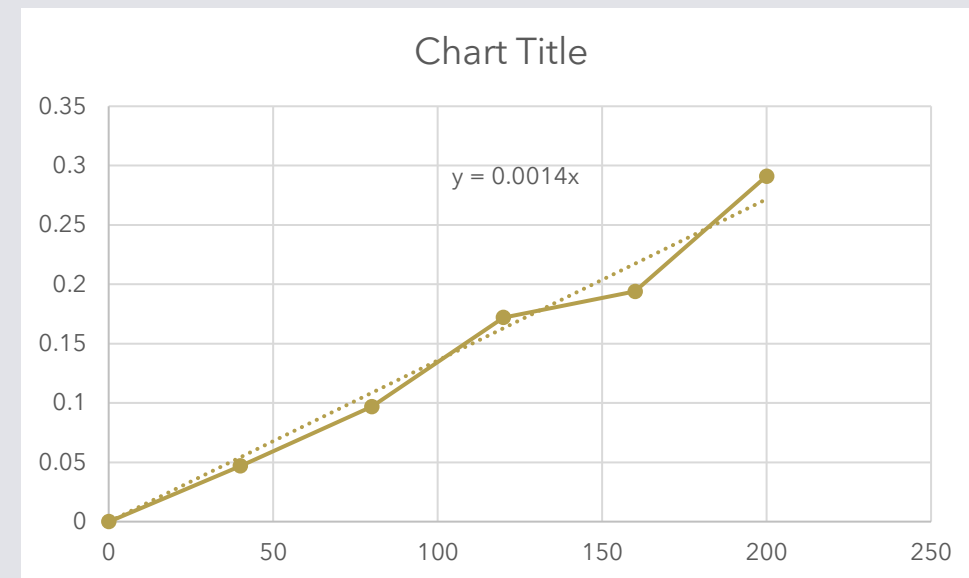


Επώαση



Φωτομέτρηση

Σωλήνας	Συγκέντρωση	Απορρόφηση
Τυφλό	-	0
1	40 µg/ml	0.047
2	80 µg/ml	0.097
3	120 µg/ml	0.172
4	160 µg/ml	0.194
5	200 µg/ml	0.291
Δ1 1:100		0.006
Δ1 1:10	49 µg/ml	0.068
Δ2 1:100		0.016
Δ2 1:10	61 µg/ml	0.086



Δ1: 485.7 µg/ml
 Δ2: 614.3 µg/ml